



## 脑中遊離型薬物濃度の代替指標と種差に関する研究

著者	永治 陽子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬第575号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00121803">http://hdl.handle.net/10097/00121803</a>

## 論文内容要旨

(題名) 脳中遊離型薬物濃度の代替指標と種差に関する研究

(氏名) 永治 陽子

### 【緒論】

医薬品開発の成功確度を高めるうえで、作用発現部位の薬物濃度と薬理作用との関係を前臨床段階から定量的に理解することが大切である。薬効モデル動物における薬力学や、毒性試験における安全性と薬物動態との関係(薬動力学, PK/PD)を考えると、フリー体理論に基づいて血漿中遊離型薬物濃度( $C_{u,plasma}$ )を作用発現部位濃度の代替として使用することが多い。しかし、脳には血液脳関門(BBB)と血液脳脊髄液関門(BCSFB)があり、密着結合とP-glycoprotein(P-gp)のような排出トランスポーターによって薬物の中枢移行が制限されている。そのため、低膜透過性化合物や排泄トランスポーターの基質化合物でフリー体理論が成り立つとは限らず、中枢作用薬の開発において、脳中遊離型薬物濃度( $C_{u,brain}$ )を前臨床段階で適切に評価し、ヒトに外挿することが求められている。

脳内では脳間質液(ISF)中の遊離型薬物が標的部位に直接作用できるため、ISF中の遊離型薬物濃度( $C_{ISF}$ )は $C_{u,brain}$ と等しいと考えられている。したがって、 $C_{ISF}$ を直接測定する、もしくは代替指標をもとに $C_{ISF}$ を見積もることが、中枢でのPK/PDの理解に必要となる。マイクロダイアリシス法は $C_{ISF}$ を直接測定できるが、多検体処理には不向きで中枢移行性評価への活用は限定的である。そのため、医薬品開発研究では、 $C_{ISF}$ の代替として脳脊髄液(CSF)中薬物濃度( $C_{CSF}$ )がよく用いられる。CSFはげっ歯類の大槽から容易に採取できるうえ、ヒトでも腰椎穿刺により採取可能である。低分子化合物はISFとCSF間を両方向性に透過できるため、 $C_{CSF}$ と $C_{ISF}$ は等しいと考えられており、これが $C_{CSF}$ を $C_{ISF}$ の代替として使用する論拠となっていた。しかし、P-gp基質薬物が、「CSFとISF間の薬物濃度勾配( $C_{CSF} > C_{ISF}$ )」と「げっ歯類と霊長類との中枢移行性の種差」を示すことが報告されており、医薬品開発における中枢移行性評価の大きな課題として認識されてきた。これまで $C_{CSF}$ と $C_{ISF}$ を直接比較した例はほとんど無いが、P-gp基質における $C_{ISF}$ の代替指標として $C_{CSF}$ が利用可能か判断するには、同一個体での $C_{CSF}$ と $C_{ISF}$ の直接比較が必須となる。また、サルなどの霊長類においても、P-gp基質に対して同様の濃度勾配の有無は未だ検討されていない。

化合物の中枢移行性の *in vivo* 評価には一般にげっ歯類が使用されるが、種差の影響を十分に把握できておらず、これまでヒト中枢移行性予測に苦慮していた。種差の有無を結論づけるには、発現量解析に加え、最終的なアウトプットである *in vivo* 条件下での P-gp 機能に基づく議論が不可欠であり、幅広い P-gp 基質性を有する化合物セットの中枢移行性を、げっ歯類と霊長類間で比較する手法が有効と考えられた。このような背景から、第一章では複数の P-gp 基質及び非基質の *in vivo* 中枢移行性を、ラット及びサルで評価した。

一方、化合物の中枢移行性を前臨床段階から適切に評価し、ヒトに外挿することは、中枢性副作用が懸念される場合にも極めて重要となる。すなわち、その結果は副作用発現のメカニズム解明や、副作用回避に向けた医薬品候補化合物の構造最適化などに活用でき、前臨床段階における中枢性副作用発現リスクの定量的評価に繋がる。中枢性副作用が要因で、有用な治療薬の開発が難しい神経痛治療領域では、末梢神経のみに発現するナトリウムチャネルのサブタイプ (Nav1.8) を選択的に阻害すれば、中枢性副作用を回避しつつ十分な鎮痛作用が得られる医薬品を開発できると考えられている。E2074 は Nav1.8 に対する選択性に加え、中枢移行を制限する目的で P-gp 基質となるよう分子設計された帯状疱疹後疼痛や糖尿病性神経痛などの治療薬候補化合物である。そこで、第二章では E2074 をモデル化合物として、中枢移行性パラメータを活用して中枢性副作用に対する安全域評価を行った。

## 【第一章：脳中遊離型薬物濃度に基づく中枢移行性の検討】

げっ歯類を用いて化合物の中枢移行性を調べるとき、CSF 採取法に加え、比較的簡便な脳組織ホモジネート法もよく用いられる。本法では、脳組織ホモジネートを用いて薬物の脳中遊離型薬物分率 ( $f_{u,brain}$ ) を算出し、これを脳中総薬物濃度 ( $C_{brain}$ ) に乗じて脳中遊離型薬物濃度 ( $C_{u,homogenate}$ ) を求める。まず、 $C_{ISF}$ 、 $C_{CSF}$  及び  $C_{u,homogenate}$  の関係を相互に比較し、 $C_{CSF}$  及び  $C_{u,homogenate}$  について、 $C_{ISF}$  の代替指標としての有用性をラットとサルで調べた。野生型ラット及び P-gp 欠損ラットに P-gp 基質及び非基質を定速静脈内投与し、定常状態での  $C_{u,plasma}$  に対する  $C_{ISF}$ 、 $C_{CSF}$  並びに  $C_{u,homogenate}$  の濃度比（それぞれ、 $K_{p,uu,ISF}$ 、 $K_{p,uu,CSF}$ 、 $K_{p,uu,homogenate}$ ）を中枢移行性パラメータとして算出し、相互に比較した。その際、比較した  $K_{p,uu}$  値が 3 倍以内であれば同等であると判断した。 $K_{p,uu,CSF}$  及び  $K_{p,uu,homogenate}$  は、概ね  $K_{p,uu,ISF}$  の 3 倍以内であり、P-gp 基質及び非基質の中枢移行性について、ラットでは方法論によらず概ね同等の結果が得られること、すなわち  $C_{CSF}$  及び  $C_{u,homogenate}$  は  $C_{ISF}$  の代替となり得ることが明らかとなった。

次に、野生型ラット及び P-gp 欠損ラットを用いて中枢移行性を評価し、P-gp 欠損が化合物の中枢移行に与える影響も調べた。その結果、P-gp 欠損ラットで P-gp 基質の  $K_{p,uu}$  値が上昇し、 $K_{p,uu,ISF}$  の変化が  $K_{p,uu,CSF}$  と同程度であることを見出した。P-gp は BBB のみならず BCSFB にも発現し、基質化合物を脳室内の CSF に取り込む方向に働くことが報告されているが、P-gp 欠損により  $K_{p,uu,CSF}$  は低下することなく  $K_{p,uu,ISF}$  と同様に上昇した。したがって、BBB における P-gp による汲み出しが  $C_{ISF}$  及び  $C_{CSF}$  の決定因子となっており、BCSFB に発現する P-gp の  $C_{CSF}$  に対する寄与は小さいものと推察された。

さらに、野生型ラット及びサルにおける中枢移行性パラメータを比較することで、げっ歯類（ラット）と霊長類（サル）の種差に関する知見を得ることとした。まず、サルの定常状態における  $K_{p,uu,ISF}$ 、 $K_{p,uu,CSF}$  及び  $K_{p,uu,homogenate}$  を算出した。 $K_{p,uu,ISF}$  と  $K_{p,uu,CSF}$  は *in vitro* ヒト P-gp 輸送活性と相関を示し、BBB における P-gp を介した能動輸送が中枢移行性の決定要因と示唆された。 $K_{p,uu,CSF}$  と  $K_{p,uu,ISF}$  を比較したところ、評価した 12 化合物全てが 3 倍以内であり、 $C_{CSF}$  は  $C_{ISF}$  を代替できることが明らかとなった。一方、 $K_{p,uu,homogenate}$  と *in vitro* ヒト P-gp 輸送活性との間に有意な相関関係は認められず、特に P-gp 基質では  $C_{u,homogenate}$  が  $C_{ISF}$  及び  $C_{CSF}$  よりも大きい傾向にあった。

引き続き、種差に関する知見を得るため、ラットとサルの中枢移行性パラメータを比較した。サルの  $K_{p,uu,ISF}$  及び  $K_{p,uu,CSF}$  は、ラットに比べやや高い傾向にあるものの、概ね 3 倍以内であった。したがって、少なくとも高膜透過性化合物については、P-gp 基質性を有するとしても中枢移行性に顕著な種差はないことが明らかとなった。一方、 $K_{p,uu,homogenate}$  はサルの方がラットより 3 倍以上高い化合物（E2074, risperidone, desloratedine, quinidine）があり、いずれも P-gp 基質であった。本研究の評価化合物においては、 $f_{u,plasma}$  及び  $f_{u,brain}$  にサルとラット間で顕著な種差は無く、 $K_{p,uu,homogenate}$  のラットとサルとの乖離は、 $K_{p,brain}$  ( $= C_{brain}/C_{plasma}$ ) がサルで大きいことに起因していた。したがって、PET 画像のような脳中総薬物濃度に基づく中枢移行性評価では、霊長類において P-gp 基質の中枢移行性を過大評価する可能性があり、むしろ  $C_{ISF}$  あるいは  $C_{CSF}$  に基づいて判断するべきであることが判明した。

## 【第二章：E2074 の中枢性副作用に対する安全域評価】

E2074 の安全域評価を試みるにあたって、まずヒト PK を予測した。前臨床の *in vitro* 及び *in vivo* データから E2074 のヒト PK モデルを樹立し、有効臨床用量を 1 日 2 回に分けて 1 回 38 mg 投与と算出した。ヒト PK 予測過程で、E2074 はラット、イヌ及びサルのいずれ

においても非線形動態を示すことが判明した。各動物種について非線形動態メカニズムを調べたところ、肝臓（ラット及びイヌ）あるいは消化管（サル）における代謝飽和が要因であった。また、E2074 は P-gp の基質であり、ヒトにおいて消化管での P-gp を介した吸収過程の飽和による可能性も考えられたが、野生型及び P-gp 欠損マウスを用いて調べたところ、E2074 の吸収に対する P-gp の寄与はほとんどないことが判った。E2074 のヒト肝代謝は低親和性の反応であること、さらに E2074 は消化管代謝に対して安定であり、消化管吸収過程においても P-gp を介した汲み出しの影響を受けないことから、E2074 が推定臨床有効用量において非線形動態を示す可能性は極めて低く、樹立したヒト線形 PK モデルは妥当と考えられた。

安全域をより高い確度で予測するため、BBB における P-gp 発現量がヒトに近いとされているサルの  $K_{p,uu,ISF}$  及び  $K_{p,uu,CSF}$  を使用してヒト  $C_{ISF}$  及び  $C_{CSF}$  を予測した。推定臨床有効用量における最大  $C_{ISF}$  ( $0.099 \mu\text{mol/L}$ ) 及び  $C_{CSF}$  ( $0.15 \mu\text{mol/L}$ ) は、ラット単回毒性試験において中枢性副作用（痙攣）が認められたときの  $C_{ISF}$  ( $5.9 \mu\text{mol/L}$ ) 及び  $C_{CSF}$  ( $5.6 \mu\text{mol/L}$ ) のそれぞれ 60 分の 1 及び 37 分の 1 と見積もられた。よって、ISF と CSF いずれの中枢移行性パラメータを用いた場合も同等の安全域が見積もられることから、E2074 は中枢性副作用に対して十分な安全域を有することが示唆された。以上のようなストラテジーにより、中枢毒性の懸念される化合物においても、中枢移行性パラメータを活用することで臨床導入に向けた妥当性の高い評価が可能となるものと考えられる。

## 【結論】

本研究では、げっ歯類および霊長類のどちらにおいても、 $C_{u,brain}$  を実験的に得ることで、P-gp 基質であっても  $C_{CSF}$  が  $C_{ISF}$  の代替指標となることを明らかにした。さらに、ヒト中枢移行性予測のうえで課題となっていた種差についての知見を得ることができた。本研究では、得られた知見を中枢性副作用にフォーカスし、P-gp 基質であった E2074 の安全域評価に活用したが、本研究の成果は、副作用の観点のみならず中枢作用薬の開発にも威力を発揮するものと期待される。

## 論文審査結果の要旨

論文提出者： 永治 陽子

論文審査委員（主査）： 眞野 成康

論文題目： 脑中遊離型薬物濃度の代替指標と種差に関する研究

薬物の有効性や安全性と薬物動態との関係は、通常フリー体理論に基づいて考えるが、中枢作用薬の場合は血液脳関門や血液脳脊髄関門の影響が大きく、血漿中の遊離薬物濃度で説明するのは難しい。動物実験による脑中遊離薬物濃度 ( $C_{u,brain}$ ) の算出は可能だが、P-糖タンパク質 (P-gp) のようなトランスポーターの機能に種差があり、ヒトへの外挿には制限がある。脳内では脳間質液中の遊離薬物が標的部位に直接作用できることから、その遊離薬物濃度 ( $C_{ISF}$ ) が作用発現と相関すると考えられる。したがって、ヒトでも採取可能な脳脊髄液中の遊離薬物濃度 ( $C_{CSF}$ ) が  $C_{ISF}$  を代替できれば、中枢における PK/PD を理解しやすくなる。しかしながら、P-gp の基質薬物における  $C_{CSF}$  と  $C_{u,brain}$  間の濃度勾配や、げっ歯類と霊長類間の中枢移行性の種差も報告されている。そこで、まずラット及びサルにおける複数の P-gp 基質の *in vivo* 中枢移行性を調べた。また、中枢性副作用の回避を目的に P-gp 基質となるように分子設計された E2074 をモデル化合物として用い、中枢移行性パラメータを活用して中枢性副作用に対する安全性評価を試みた。

ラットあるいはサルの脳組織ホモジネートを用いて脑中遊離型薬物分率を算出し、これを脑中総濃度に乗じて得られる  $C_{u,brain}$  と、 $C_{ISF}$  並びに  $C_{CSF}$  との関係を調べた。ラット及び P-gp 欠損ラットを用いて、P-gp 基質及び非基質の血漿中遊離薬物濃度に対する三者の比率を求めたところ、ラットでは P-gp の基質如何にかかわらず三者間で同等の結果が得られ、 $C_{CSF}$  及び  $C_{u,brain}$  は、どちらも  $C_{ISF}$  を代替できることが判った。一方、P-gp 基質の  $C_{u,brain}$  が  $C_{ISF}$  及び  $C_{CSF}$  よりも大きくなり、その傾向はサルにおいてより顕著であったものの、サルでも  $C_{CSF}$  は  $C_{ISF}$  を代替できることが明らかとなった。

モデル化合物である E2074 は、ラット、イヌ、サルにおいて非線形動態を示した。原因は肝臓あるいは消化管における代謝飽和であったが、ヒトでの肝及び消化管代謝の影響は限定的であり、吸収過程で P-gp の影響も受けないことから、ヒトでは線形動態を示すと考えられた。それをもとにラット単回毒性試験の結果をヒト  $C_{ISF}$  及び  $C_{CSF}$  の予測値と比較したところ、中枢性副作用に対して十分な安全域を有することが示唆された。

以上、本研究はげっ歯類及び霊長類において、P-gp 基質及び非基質の  $C_{CSF}$  が  $C_{ISF}$  の代替指標となることを見出し、中枢作用薬開発に関する前臨床試験の臨床への橋渡しに貢献する重要な知見を得たことから、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。